



肝臓特異的有機アニオントランスポーターOATP 1B1およびOATP 1B3を介した薬物 尿毒症物質相互作用に関する研究

著者	佐藤 紀宏
号	49
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博（薬科）第12号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121680

肝臓特異的有機アニオントランスポーターOATP1B1 および OATP1B3 を介した 薬物-尿毒症物質相互作用に関する研究

病態分子薬学分野 佐藤 紀宏

【背景・目的】

腎障害のある患者に腎排泄型薬物を投与する時、一般に血清クレアチニン値などを用いて算出される推定糸球体濾過速度(glomerular filtration rate, GFR)を腎機能の指標として、薬物の投与設計が行われる。しかしながら、腎不全時には、腎排泄型のみならず様々な薬物の体内動態が変動することが知られており¹⁾、この一因として、体内に蓄積した尿毒症物質による肝代謝酵素阻害の関与が指摘されている²⁾。尿毒症物質は、その化学構造から薬物の肝取り込みに働く膜タンパク質と親和性を有する可能性が考えられるが、これまでのところ、それらの肝移行や、薬物の肝取り込みへの影響に関する知見はきわめて少ない。こうした背景から、腎不全患者における薬物投与設計をより高精度にするために、薬物の肝取り込みに重要な役割を担う有機アニオントランスポーターOATP1B1 および OATP1B3 を介した薬物-尿毒症物質相互作用に関する研究を行った (Figure 1)。

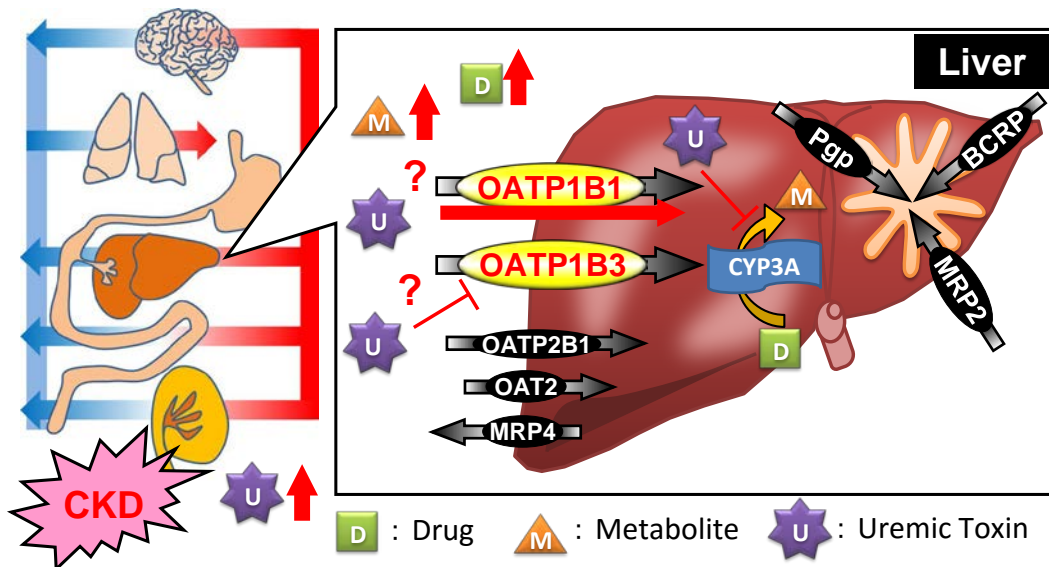


Figure 1. Drug-uremic toxin interactions through OATP1B1 and OATP1B3

【方法】

1. OATP1B1 および OATP1B3 発現 HEK293 細胞における基質および薬物の取り込み

OATP1B1, OATP1B3 および空ベクターを導入したヒト胎児由来腎細胞株 HEK293 細胞はすでに樹立されたものを用いた。 [³H]Estron-3-sulfate(E₃S)、 [³H]taurocholate(TCA)、 および [³H]methotrexate(MTX)の細胞内放射能は、液体シンチレーションカウンター(Packard, 1600TR)で測定した。

2. 尿毒症物質の 50%阻害効果を示す濃度 (IC₅₀値)の算出 (速度論的解析)

OATP1B1 および OATP1B3/HEK293 細胞の取り込み量から、mock 細胞による非特異的な取り込み量を差し引いて、トランスポーター特異的な取り込み量を算出した。

下記の (Eq. 1) に基づいて、各基質の取り込みにおいて尿毒症物質が 50% 阻害を示す濃度 (IC_{50} 値) を求めた。

$$V = 100 \times IC_{50} / (IC_{50} + [I]) + A \quad (\text{Eq. 1})$$

V : 取り込み量 (% of control)、[I] : 尿毒症物質濃度、A : 非特異的取り込み量 (% of control)
 IC_{50} 値は非線形最小二乗法により算出した (Origin 8)。

3. 尿毒症物質の取り込み評価

細胞内の [3H]indole-3-acetic acid の放射活性は、液体シンチレーションカウンターで測定した。Kynurenic acid、indoxyl sulfate および *p*-cresol の細胞内量は liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) で測定した。

【結果・考察】

第一章では、個々の腎不全患者で血中濃度の変動する尿毒症物質の、OATP1B1 および OATP1B3 の薬物輸送に対する影響を調べるために、まず両トランスポーターの基質輸送に対する尿毒症物質の IC_{50} 値を求めた。尿毒症物質は、その化学構造により数種類のグループに分類される。本研究では、そのうち 18 種類の尿毒症物質を用いた。その結果、kynurenic acid (1000 μM)、indole-3-acetic acid (10000 μM)、indoxyl sulfate (10000 μM)、および *p*-cresol (10000 μM) は、OATP1B1 および OATP1B3 の輸送を 50% 以上阻害した。これらの 4 つの尿毒症物質は、OATP1B1 および OATP1B3 の基質輸送を濃度依存的に阻害し、 IC_{50} 値はそれぞれ、180 および 180 μM (kynurenic acid)、770 および 1100 μM (indole-3-acetic acid)、2700 および 1300 μM (indoxyl sulfate)、4600 および 1700 μM (*p*-cresol) であった (Figures 2 and 3)。さらに、OATP1B1 および OATP1B3 の輸送を、CMPF および urea をはじめとするいくつかの尿毒症物質が中程度 (20-50%) に阻害する

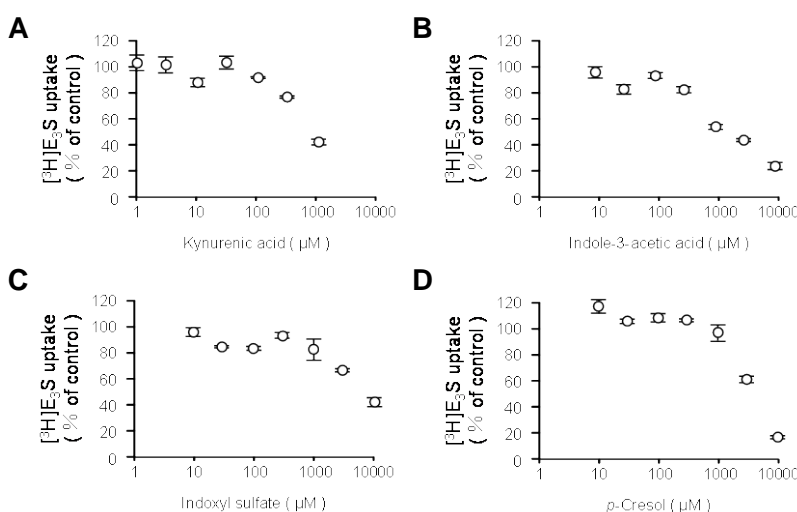


Figure 2. Inhibitory effects of uremic toxins (kynurenic acid (A), indole-3-acetic acid (B), indoxyl sulfate (C), and *p*-cresol (D)) on OATP1B1-mediated transport

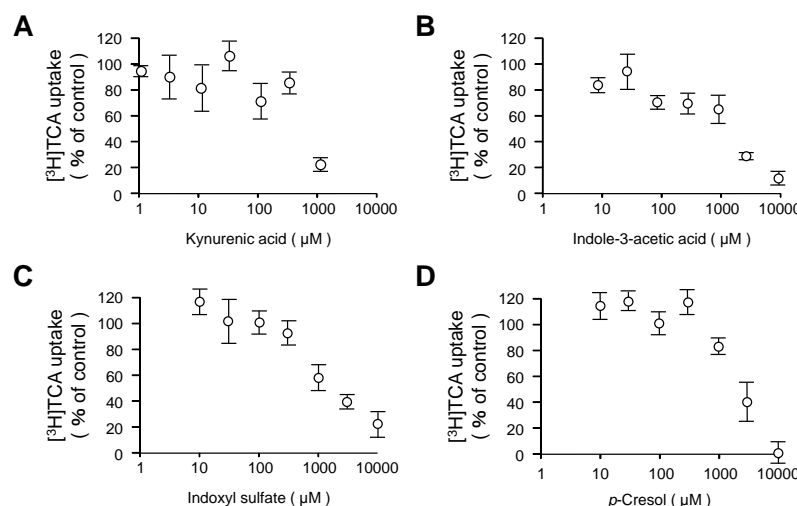


Figure 3. Inhibitory effects of uremic toxins (kynurenic acid (A), indole-3-acetic acid (B), indoxyl sulfate (C), and *p*-cresol (D)) on OATP1B3-mediated transport

さらに、OATP1B1 および OATP1B3 の輸送を、CMPF および urea をはじめとするいくつかの尿毒症物質が中程度 (20-50%) に阻害する

ことを見出した。また、L-kynurenine のみが選択的に OATP1B1 の基質輸送を阻害し、逆に 5 つの尿毒症物質 (creatinine、guanidine、methylguanidine、hippuric acid、および mannitol) が選択的に OATP1B3 の基質輸送を阻害した。これらの結果より、indoxyl sulfate、*p*-cresol およびその他の多くの尿毒症物質が、OATP1B1 に比べて OATP1B3 の輸送をより強く阻害することが示唆された。このことから、テルミサルタンのように OATP1B3 の選択的な基質となる薬物の体内動態は、OATP1B1 および OATP1B3 の双方の基質となる薬物に比べて、腎不全時に体内に蓄積する尿毒症物質によって、より強く影響されることが推測された。

一方、OATP1B1 および OATP1B3 に親和性のある化合物が輸送基質や阻害剤として振舞うのみならず、他の基質の輸送をアロステリック調節する場合もある。このため、トランスポーターを介した薬物相互作用の評価において、用いる基質(薬物)により異なる結果が得られる可能性が考えられる。そこで、モデル薬物として MTX を用いて、OATP1B1 および OATP1B3 の基質輸送を濃度依存的に阻害した 4 つの尿毒症物質、kynurenic acid、indole-3-acetic acid、indoxyl sulfate、および *p*-cresol の阻害効果を調べた。その結果、これらの尿毒症物質は、OATP1B1 および OATP1B3 の³H]MTX 輸送を濃度依存的に阻害し、両トランスポーターの薬物輸送にも影響することがわかった (Figure 4)。今回、モデル薬物として用いた MTX は、薬物動態の個体間変動が大きく、投与量調節が難しい。腎障害や肝障害時に、MTX

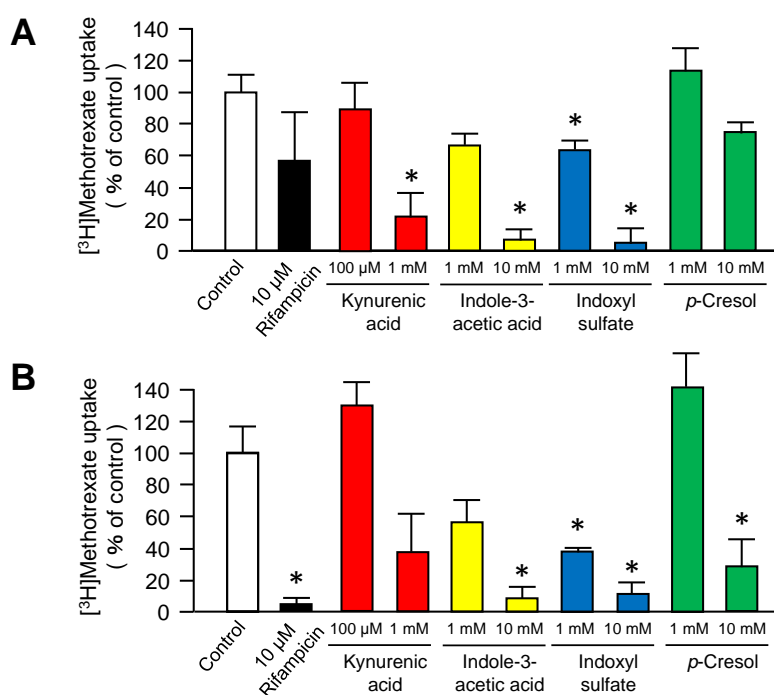


Figure 4. Inhibitory effects of uremic toxins on ³H]MTX uptake by OATP1B1- (A) and OATP1B3-expressing HEK293 cells (B)

の代謝および排泄が遅延する可能性があり、血中濃度が上昇して重篤な副作用を惹起しかねないために投与禁忌となっているが、本研究成果により、MTX 体内動態に対する尿毒症物質の影響を考慮する必要性が示唆され、しかもそこに OATP1B1 および OATP1B3 を介した MTX の肝取り込み低下が関与することが示された。

本研究で求めた IC₅₀値を用いて、それぞれの尿毒症物質の既報で最も高い血中濃度における肝 OATPs による輸送阻害をシミュレーションしたところ、kynurenic acid、indole-3-acetic acid、indoxyl sulfate、および *p*-cresol は、OATP1B1 の輸送を最大で 78、94、74、および 92%に低下させ、OATP1B3 の輸送を 78、96、58、および 82%に低下させることが予測された。このことから、indoxyl sulfate は、他の尿毒症物質に比べて OATP1B3 の輸送を強く阻害することが示唆された。一方、他の尿毒症物質による肝 OATP による輸送阻害は弱いと予測される。尿毒症物質は肝臓のトランスポーター

発現を変動させることが報告されている³⁾。腎不全時には、ほぼ全ての尿毒症物質の血中濃度が上昇するため、肝OATPによる薬物の取り込みを抑制し、トランスポーターの発現も変動することで、相乗的にこれらのトランスポーター輸送能は抑制されると考えられる。したがって、腎不全時には、腎排泄型薬物のみならず、肝排泄型薬物の投与量調節も慎重に行う必要があることが示唆された。

第二章では、前章でOATP1B1およびOATP1B3の輸送阻害効果が強く認められた4種の尿毒症物質、kynurenic acid、indole-3-acetic acid、indoxyl sulfate、およびp-cresolが、これらのトランスポーターの輸送基質になり得るかについて調べた。その結果、kynurenic acidはOATP1B1およびOATP1B3の両方の輸送基質

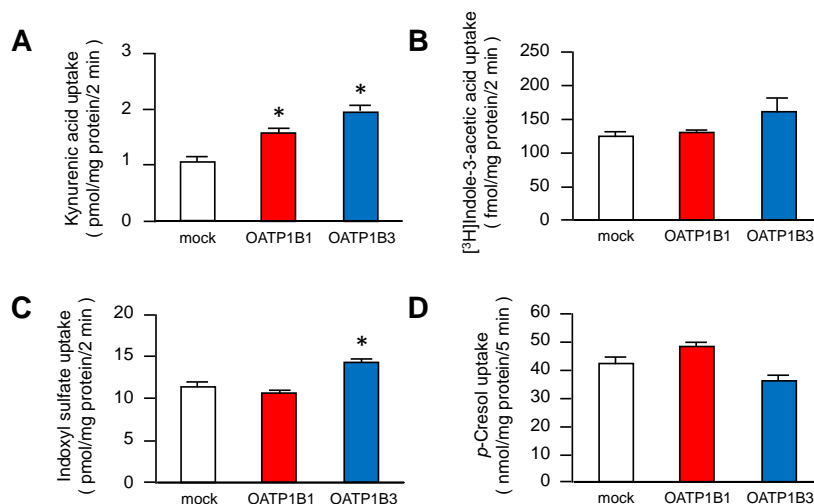


Figure 5. Uremic toxins (kynurenic acid (A), indole-3-acetic acid (B), indoxyl sulfate (C), and p-cresol (D)) uptake by OATP1B1- and OATP1B3-expressing HEK293 cells

OATP1B3の輸送基質になることが明らかとなった (Figure 5A and 5C)。一方、indole-3-acetic acid および p-cresol は、OATP1B1 および OATP1B3 に輸送されなかった (Figure 5B and 5D)。これまでに、尿毒症物質は一部の肝代謝酵素を阻害することや、肝臓のトランスポーターの発現を変動させることが報告されている^{3,4)}。本研究の成果より、尿毒症物質の肝細胞内環境への移行には、OATP1B1 および OATP1B3 を介した肝取り込み過程が重要な役割を果たすことが示唆された。また、これらのトランスポーターを介して尿毒症物質が肝細胞内に蓄積することで、代謝酵素や肝臓に発現するトランスポーターの機能変動を引き起こすことも考えられる。このように、腎障害時に尿毒症物質によって引き起こされる肝障害や薬物-尿毒症物質相互作用を説明するには、尿毒症物質の肝取り込みメカニズムに関する詳細な研究が必要不可欠であると考えられる。

【結論】

本研究の成果は、腎不全患者においてOATP1B1およびOATP1B3を介した薬物-尿毒症物質相互作用が起きる可能性を示しており、腎排泄型薬物のみならず、OATP1B1およびOATP1B3に輸送される薬物の投与量調節の重要性を強く示唆した。

【参考文献】

1. Naud J. *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.*, **52**: 10S-22S, 2012.
2. Volpe DA. *et al.*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **68**: 297-303, 2014.
3. Naud J. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 124-128, 2008.
4. Leblond F. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**: 326-332, 2001.

論文提出者: 佐藤 紀宏

論文審査委員 (主査): 眞野 成康

論文題目: 肝臓特異的有機アニオントランスポーターOATP1B1 および OATP1B3
を介した薬物-尿毒症物質相互作用に関する研究

薬物の主要な排泄臓器である腎臓に障害が起こると、薬物動態が大きく影響される。一般に血清クレアチニン値などから算出される推定糸球体濾過速度を腎障害の指標とし、それに基づいて腎排泄型薬物の投与量が調節される。腎障害が進行して腎不全に陥ると、体内に多くの尿毒症物質が蓄積し、それらがさらに様々な疾患に関与する。最近、尿毒症物質の一部が、肝臓において薬物代謝酵素の活性を阻害することや、肝臓からの薬物排出トランスポーターの機能を阻害することが報告されており、尿毒症物質が肝における薬物動態に影響する可能性が示唆されている。一方、尿毒症物質の中には有機アニオンが多く、それらは肝に発現する薬物の肝取り込みトランスポーターの作用に影響することが考えられる。そこで本研究では、有機アニオントランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 を介する薬物と尿毒症物質の相互作用について調べた。

まず、OATP1B1 あるいは OATP1B3 を発現させた HEK293 細胞を用い、両トランスポーターの典型的基質であるエストロン-3-サルフェートとタウロコール酸の放射性同位体標識体の細胞内取り込み活性に対する各尿毒症物質の阻害効果を調べたところ、キヌレニン酸(1000 μ M)、インドール-3-酢酸(10000 μ M)、インドキシル硫酸(10000 μ M) および *p*-クレゾール(10000 μ M)が両者の輸送を 50%以上阻害し、用量依存性も認められた。また、他にも弱いながら両トランスポーターの輸送を阻害する尿毒症物質があったが、どちらか一方の輸送しか阻害しないものもあった。

次に、モデル薬物としてメトトレキサートを用い、両トランスポーターの取り込み活性に対する 4 種の尿毒症物質の影響を調べた。その結果、いずれも両トランスポーターの薬物輸送活性を阻害し、腎障害や肝障害時の本薬物の体内動態変動に、尿毒症物質が関与する可能性が考えられた。特にインドキシル硫酸の血中濃度を考慮すると、これら 4 種のうち臨床上最も影響が出やすいことから、腎不全時の血液中の存在量に注意する必要があるものと考えられた。さらに、OATP1B1 および OATP1B3 によってキヌレニン酸が肝臓に取り込まれること、また OATP1B3 によってインドキシル硫酸が輸送されることが判明した。以上、本研究は、腎不全患者において OATP1B1 および OATP1B3 を介した薬物-尿毒症物質間の相互作用が、薬物の体内動態に影響することを示唆し、併せて腎障害時に腎排泄型薬物のみならず肝排泄型薬物の投与量調節も重要であることを示した。本研究の成果は、学術的にも臨床上においても極めて有用なものであることから、博士 (薬科学) の学位論文として合格と認める。